

日 本 国 特 許 庁

2000.12.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 19 JAN 2001

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年10月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第309984号

出 願 人

Applicant (s):

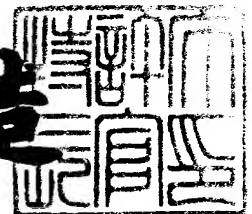
森下 竜一
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3097867

【書類名】 特許願

【整理番号】 132645

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/18

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 2 - 1 1 - 2 2 - 5 0 2

【氏名】 森下 竜一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市桜ヶ丘 2 - 7 - 2 9

【氏名】 荻原 俊男

【特許出願人】

【識別番号】 595068287

【氏名又は名称】 森下 竜一

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を虚血部位に注入することからなる糖尿病性虚血性疾患治療剤。

【請求項 2】

糖尿病性虚血性疾患が下肢虚血性疾患であり、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を下肢筋肉内に注入することからなる請求項 1 記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

【請求項 3】

肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤がセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム製剤である請求項 1 または 2 記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

【請求項 4】

肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を必要に応じて複数回投与することとを特徴とする、請求項 1、2 または 3 記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

【請求項 5】

肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子として少なくとも $50 \mu g$ を用いることを特徴とする、請求項 1、2、3 または 4 記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、HGF 遺伝子を虚血部位に注入することにより、糖尿病性の虚血性疾患を治療するための HGF 遺伝子治療剤に関する。詳しくは、HGF 遺伝子のセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム製剤を下肢虚血部位に注入することにより、糖尿病性の下肢虚血性疾患を治療するための HGF 遺伝子治療剤に関する。さらに詳しくは、虚血患部及びその周辺の筋肉局所部位に投与することからなる筋肉内投与用治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

肝実質細胞増殖因子（HGF）は成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（*Biochem Biophys Res Commun*, 122, 1450（1984）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6489,（1986）、*FEBS Letter*, 22, 231（1987）、*Nature*, 342, 440（1989）、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3200（1991））。その後の研究により、HGFは*in vivo*において肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた（*Symp. Soc. Exp. Biol.*, 47 cell behavior, 227-234（1993）、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1937-1941（1993）、*Circulation*, 97, 381-390（1998））。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてHGFを投与すると、顕著な血管新生が見られ血流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてHGFが発現、機能していると考えられるようになった。

【0003】

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となった。

【0004】

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与の多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するHGFの投与に関しても、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている（*Circulation*, 97, 381-390（1998））。このような動物モデルに対する静脈あるいは動脈内投与によ

り、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するHGFの有効性が明らかにされているものの、具体的なHGFの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。特にHGFタンパクの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、HGFタンパクの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

また一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされており、HGF遺伝子を用いて、心臓領域への遺伝子治療が試みられようとしている。遺伝子の導入法については、例えば冠動脈内拡散注入法等の幾つかの報告があるものの、本発明のような虚血部位への注入法など、特に骨格筋に対する筋肉内注入法を用いて、具体的な糖尿病性虚血性疾患に対して、効果を示した例は見出されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、これまで有効な治療法が見出せていない糖尿病性虚血疾患の治療に好適なHGF遺伝子治療剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはHGF遺伝子を糖尿病性の虚血性疾患あるいは動脈疾患に適応するにあたり、投与量、投与法の検討を鋭意行ったところ、上記疾患に対するHGF遺伝子の投与方法として、安全かつ効率の良い遺伝子導入法を用いて直接虚血患部に注入することで有効な効果が得られることを見出した。導入ベクターとしては、公知の発現ベクターを使用することができ、ウイルスベクターを用いた場合が好ましく、特にセンダイ・ウイルス(HVJ)リポソーム法(Molecular Medicine, 30, 1440-1448(1993)、実験医学, 12, 1822-1826(1994))を用いて直接虚血患部の心筋または筋肉内に、特に下肢骨格筋層に注入することで有効な効果が得られることを見出した。また、病状に応じて、何回でも当該遺伝子を投与することが可能であり、これによりよりの確な当該疾患の治療が出来ることを見出した。

【0007】

すなわち本発明の要旨は、

〔1〕肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を虚血部位に注入することからなる糖尿病性虚血性疾患治療剤。

〔2〕糖尿病性虚血性疾患が下肢虚血性疾患であり、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を下肢筋肉内に注入することからなる上記〔1〕記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

〔3〕肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤がセンダイ・ウイルス（HVJ）リポソーム製剤である上記〔1〕または〔2〕記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

〔4〕肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子製剤を必要に応じて複数回投与することを特徴とする、上記〔1〕、〔2〕または〔3〕記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

〔5〕肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子として少なくとも50 μ gを用いることを特徴とする、上記〔1〕、〔2〕、〔3〕または〔4〕記載の糖尿病性虚血性疾患治療剤。

である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明において使用される「HGF遺伝子」とは、HGF（HGFタンパク）を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440 (1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967 (1989)などに記載のHGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが挙げられる。ここでHGF・cDNAの塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をハイブリダイゼーションのプロブ又はPCRのプライマーとし、例えば肝臓や白血球由来のcDNAライブラリー等を用いることにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

【0009】

さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質がHGFと実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、などのうち、HGFとしての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1) 及び2) のDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

【0010】

HGF遺伝子は、遺伝子やcDNAあるいは適当なベクターに組み込んだものが使用できる。ベクターとしては、公知の発現ベクターを使用することができる。例えば、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス(HIV)等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターの内、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

さらには、さらには、pBR 322、pBU 110、Tiプラスミド等のプラスミドベクターを挙げることができる。

本発明のHVJリポソーム製剤とは、例えば、Molecular Medicine, 30, 1440-1448(1993)、実験医学, 12, 1822-1826(1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813(

1997)等に記載の方法に用いる製剤であり、好ましくは、Circulation,92(Suppl. II),479-482(1995)に記載の製剤を用いることが挙げられる。なおH V JとしてはZ株(ATCCより入手可能)が好ましいが、基本的には他のH V J株(例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など)も用いることができる。

【0011】

本発明で導入されるH G F遺伝子以外に、血管新生作用を有する公知の因子を併用することが可能である。例えば、V E G FやF G F等の因子は血管新生作用を有することが報告されており、これらの遺伝子を使用することが出来る。又、E G F等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。

本発明でいう虚血性疾患とは、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞などである。

本発明では、このようにH G F遺伝子を単独に或いは組み合わせて虚血性疾患の虚血部位内に導入し、高度に発現させて、もともと発現量の少ないH G F蛋白を合成させることができる。特に、下肢虚血部位の骨格筋内に導入することにより、虚血患部の血管新生を促進させ血流量の改善を図り、虚血患部の機能の回復正常化を行うことが出来る。また、重症の糖尿病性虚血性疾患の患者だけでなく、進行中の軽度の患者にも使用することができる。

【0012】

本発明の遺伝子製剤の一態様であるH V Jリポソーム製剤は、上記H V Jリポソーム法で投与されるために調整された遺伝子製剤であり、非経口的に投与することが好ましい。より好ましいものとして、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更には、エコー下視覚的に非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与を挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心室内腔より心筋内に直接H G F遺伝子を注入することが挙げられる。

【0013】

本発明のH G F遺伝子を適用することにより、糖尿病性の虚血性疾患の患者に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、例えば、糖尿病性下肢

虚血性疾患の患者においては、従来であれば外科的な患部の切除以外には道のなかった重症の患者に対して、機能の回復が可能となった。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、成人患者 1 人当たり約 $1 \mu\text{g}$ ～ 約 50mg の範囲、好ましくは約 $10 \mu\text{g}$ ～ 約 5mg 、より好ましくは約 $50 \mu\text{g}$ ～ 約 5mg の範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

【0014】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実験材料及び方法

HVJ リポソーム製剤の作製

10mg の乾燥脂質（ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの 1:4.8:2 の混合物）と、HGF 遺伝子（ $100 \mu\text{g}$ ）-HMG1（high mobility group 1 nuclear protein, $25 \mu\text{g}$ ）を含有する等張液（ 137.0mM NaCl, 5.4mM KCl, 10.0mM Tris-HCl; pH7.6） $200 \mu\text{l}$ を混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリポソームを形成する。精製センダイウイルス（Z 株）を 3 分間 UV 照射（ $110 \text{erg}/\text{mm}^2/\text{sec}$ ）して使用する。リポソーム懸濁液とセンダイウイルス（HVJ）を混合して 4°C 10 分間、続いて 37°C 30 分間加温する。遊離の HVJ を除去して、HVJ リポソーム製剤を取得する。

実験動物

投与群：糖尿病ラット（DM-ラット）の下肢虚血ラット

コントロール・ラット：正常ラットの下肢虚血ラット

HVJ リポソーム製剤の投与法

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した 16 週齢の糖尿病ラット（1 群 6 匹）に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態を作成した。

HGF 遺伝子の HVJ リポソーム製剤を下肢虚血骨格筋に注入した。投与量は

治療目的に応じて適宜増減することが可能である。

検討内容

リポソーム製剤投与後、側副血行路形成および血流改善効果の指標としてレーザー散乱光解析によるレイザー・ドップラー・イメージャー (LDI) を用いて下肢血流を測定した。正常下肢に対する虚血下肢の色調ヒストグラム (colored histogram) の平均値を血液還流比率 (perfusion ratio) とした。

下肢虚血部分の毛細血管密度をアルカリフオスファターゼ染色標本 (ALP) で測定し、糖尿病下肢虚血ラット群とコントロールの下肢虚血ラット群とで比較した。あるいは、HGF 遺伝子の投与群と未投与群とで比較した。

【0015】

参考例 1

糖尿病ラットの下肢虚血部位における HGF 発現状況

腹腔内にストレプトゾトシンを投与して誘発した16週齢の糖尿病ラット (1群 6匹) およびコントロール群として16週齢の正常のラット (1群 6匹) に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。

1週間後、レイザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった (図1参照)。

3週間後、5週間後にも、虚血部位の血液還流比率を測定したところ、同様に糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった (図1参照)。

筋肉内の内在性 HGF の濃度は、糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の筋肉内においてコントロールの下肢虚血ラットの筋肉内よりも顕著に低いものであった。この結果は、糖尿病において血管新生が不良である原因が筋肉内の内在性 HGF の減少によるものであることを示している。このため、糖尿病下肢虚血ラットでは、血管新生が起こりにくくなり、側副血行路が発達しないと考えられる (図2参照)。

【0016】

実施例 1

糖尿病下肢虚血ラットに対する HGF 遺伝子治療

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した16週齢の糖尿病下肢虚血ラット（1群6匹）および16週齢の下肢虚血ラット（1群6匹）に対して、片側大腿動脈の一部の外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。大腿動脈の外科的切除後、HGF 遺伝子（50 μ g）HVJリポソーム製剤を下肢虚血部位の筋肉内に注入した。

3週間後、レーザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。HGF 遺伝子が投与された糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットや未投与の上記糖尿病下肢虚血ラットと比較し、顕著な増加を示した。

コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率を100%とすると、HGF 遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは67%であり、HGF 遺伝子を投与した糖尿病下肢虚血ラットでは129%であった。結果を図3に示す（参照図1）。

【0017】

実施例 2

糖尿病下肢虚血ラットに対する HGF 遺伝子治療

上記と同じ様に処置をした糖尿病下肢虚血ラット、コントロールの下肢虚血ラットを作成し、HGF 遺伝子治療を行った。5週間後に各ラットの下肢虚血部の骨格筋を取り出し、ALP染色し単位面積当たりの血管数を比較した。HGF 遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは、コントロールの下肢虚血ラットと比較して有意に血管数が少なく、HGF 遺伝子投与の糖尿病下肢虚血ラットは血管数が有意に増加していた。結果を図4に示す。

【0018】

参考例 2

血管内皮細胞による MMP-1 の産生に対するグルコース濃度および HGF 添加の影響

血管内皮細胞（ヒト大動脈由来）を無血清下で、グルコース濃度が0、25 mM、50 mMとなるような3種の培地で培養し、24時間培養後の培養液上清の

MMP-1 濃度を測定した。

また各々、グルコース添付の30分前にHGFを100 ng/mlで添加した場合と比較した。

上清中のMMP-1濃度が、グルコースの濃度依存的に有意に減少し、HGF処理によりMMP-1の減少が止まり増加することが示された。結果を図5に示す。

【0019】

参考例3

血管内皮細胞に対するHGFの効果（血管新生に係わる転写因子ETS-1の変化）

参考例1と同様に血管内皮細胞を培養し、細胞中に発現する転写因子ETS-1のmRNA量を測定した。コントロールの内皮細胞の、ETS-1のmRNA量を100%とすると、HGF未添加の血管内皮細胞では高グルコースの条件により有意に減少していた。一方、HGF添加の血管内皮細胞ではコントロールの発現量と比較して同等以上になっていた（ $P<0.01$ ）。結果を図6に示す。

【0020】

以上のように、高グルコース条件下の血管内皮細胞では、血管新生のために必須のマトリックス分解酵素であるMMP-1の産生が減少し、血管新生時に発現、増加する転写因子であるETS-1のmRNA発現が低下していた。

上記のことから、高グルコース条件下では血管新生がおこりにくくなっていることが明らかにされた。一方、高グルコース条件下の血管内皮細胞にHGFを添加することにより、MMP-1の産生、ETS-1のmRNAの発現が顕著に増加し、HGFにより血管新生がおこりやすくなっていることが示された。

【0021】

【発明の効果】

本発明の糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療剤は、HGFの発現不良に起因する糖尿病性虚血患部に特有の血管新生不良を改善し、顕著な血管新生作用を示すことから、虚血患部の血流量を増大させ病状を改善することができる。しかも、本発明の治療剤は患者の病状に応じて1回以上の筋肉内投与を行うことにより、その

目的である血管新生を促進することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞をよりの確に治療することができるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群との血液還流比率 (Perfusion ratio) の経時的変化を示したグラフ。

【図2】参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における虚血筋肉内の内在性HGF濃度を示したグラフ。

【図3】実施例1の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF遺伝子投与群、未投与群と正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群の血液還流比率を3週間後に測定した結果を比較を示したグラフ。

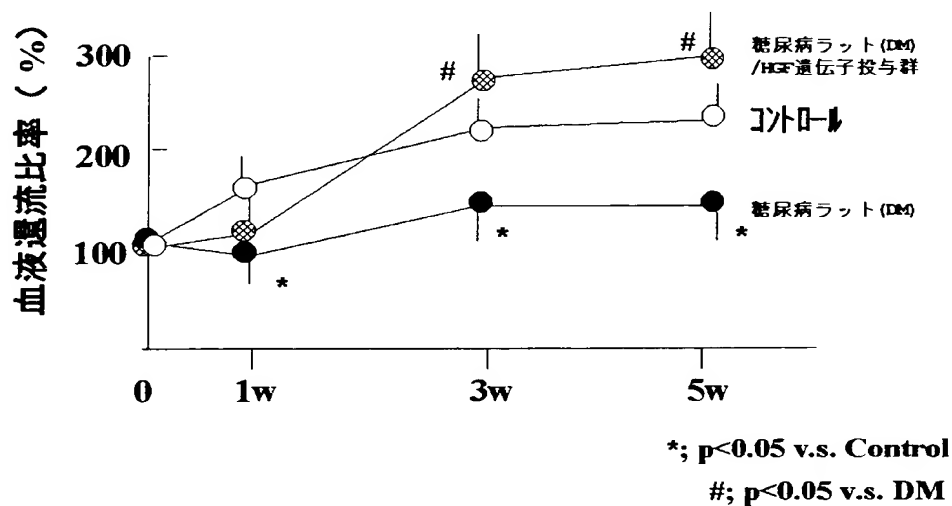
【図4】実施例2の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF遺伝子投与群、未投与群と正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群の下肢虚血部の骨格筋AをLP染色し、単位当たりの血管数を比較を示したグラフ。

【図5】参考例2のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群、未添加群とグルコースを添加していないコントロール群の培養液上清のMMP-1濃度を測定した結果を示すグラフ。

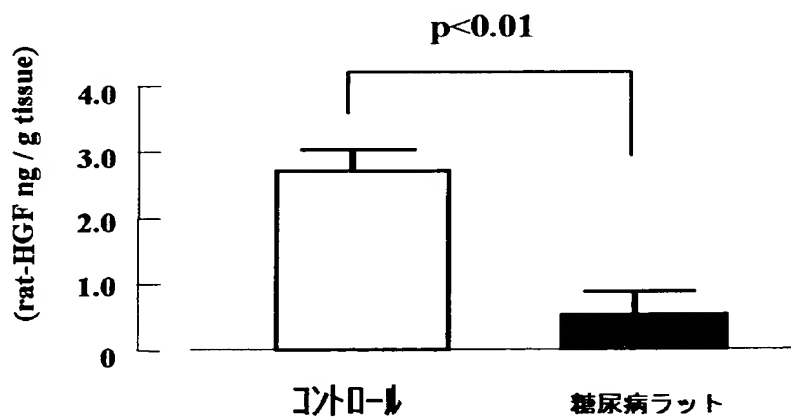
【図6】参考例3のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群、未添加群とグルコースを添加していないコントロール群の血管内皮細胞中に発現する転写因子ETS-1のmRNA量を測定した結果を示すグラフ。

【書類名】 図面

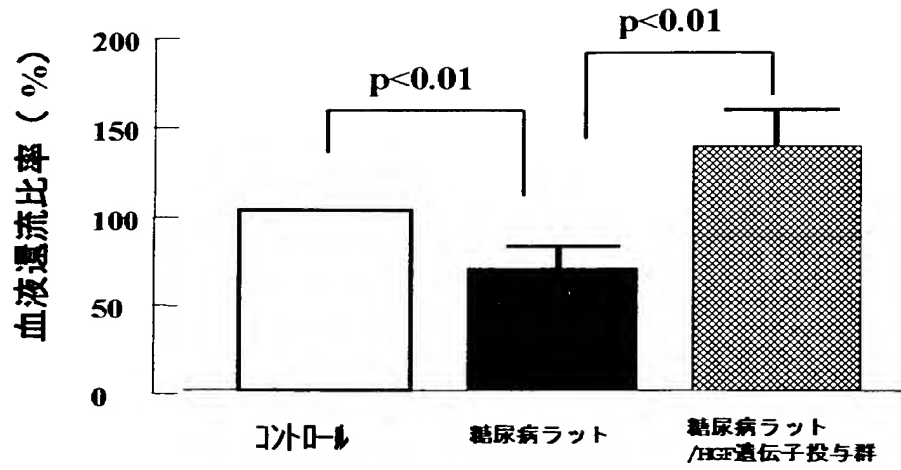
【図 1】



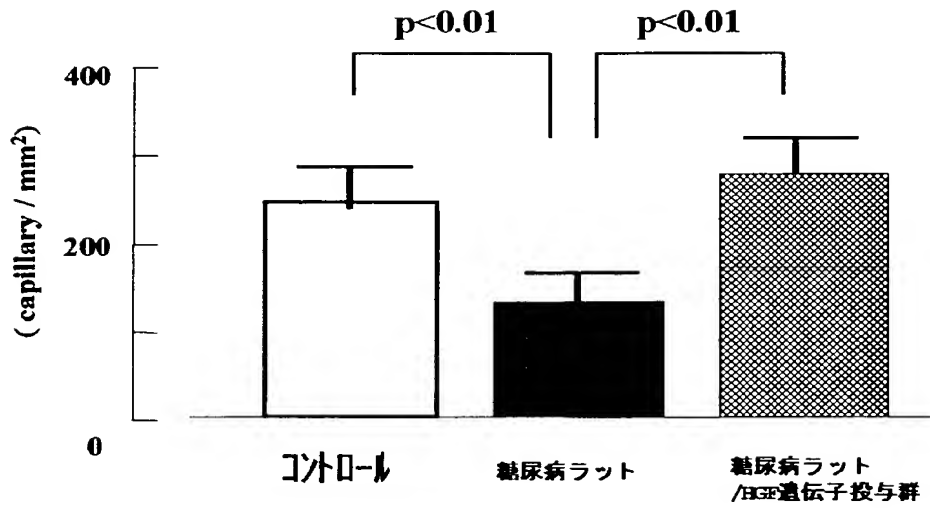
【図 2】



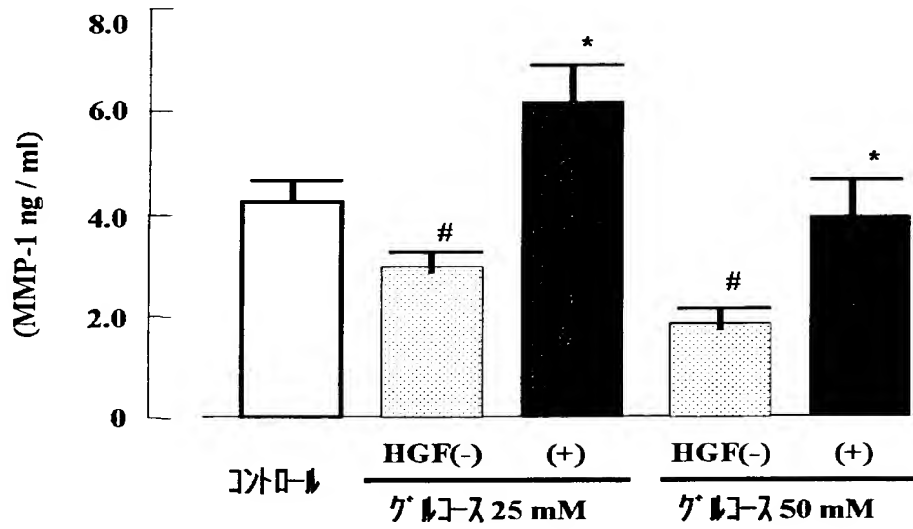
【図 3】



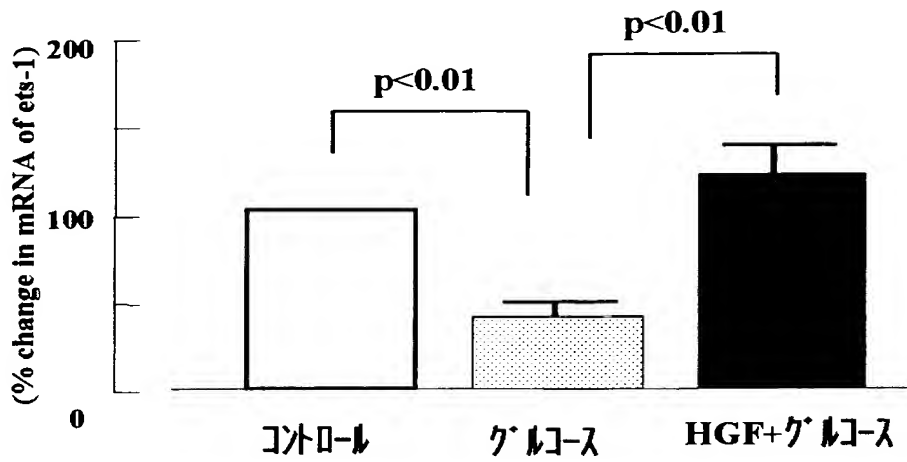
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 糖尿病性虚血性疾患を治療するためのHGF遺伝子治療用製剤。

【効果】 糖尿病性虚血部位にHGF遺伝子を投与することにより、糖尿病による低下した虚血部位の血管新生の促進を図り、虚血性疾患を回復させるという効果を有する。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第309984号
受付番号	59901064648
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年11月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月29日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595068287]

1. 変更年月日 1995年 5月12日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502

氏 名 森下 竜一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社

